

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-508777

第1部門第2区分

(43) 公表日 平成6年(1994)10月6日

| | | | |
|---------------------------|-------|-----------|-----|
| (51) Int.Cl. ³ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I |
| A 6 1 L 27/00 | | F 7252-4C | |
| A 6 1 K 9/14 | | L 7329-4C | |
| 37/02 | A B J | 8314-4C | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平5-501625
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)6月22日
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)12月8日
 (86) 国際出願番号 PCT/US92/05309
 (87) 国際公開番号 WO93/00050
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)1月7日
 (31) 優先権主張番号 718, 721
 (32) 優先日 1991年6月21日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), AU, BR, CA, FI, JP, KR, NO, RU, US

(71) 出願人 ジェネティックス・インスティテュート・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02140、ケンブリッジ、ケンブリッジパーク・ドライブ87番
 (72) 発明者 ロン、エイアル
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02173、レキシントン、グラント・ストリート71番
 (72) 発明者 タレック、トーマス・ジェイ
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02124、ボストン、ピアース・アベニュー65番
 (74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨形成性蛋白医薬処方物

(57) 【要約】

骨形成蛋白：ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）および乳酸とグリコール酸とのコポリマーからなる群より選択される高分子マトリックス；そして骨形成性蛋白局在化物質の医薬上許容される混合物よりなる組成物。

請求の範囲

1. (i) 骨形成性蛋白と、
 - (ii) ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)および乳酸とグリコール酸とのコポリマーからなる群より選択される高分子マトリックス成分と、
 - (iii) 骨形成性蛋白を局在化させるアルキルセルロース
 との医薬上許容される混合物よりなることを特徴とする組成物。
2. 骨形成性蛋白がBMP-族の組成要素からなる群より選択される請求項1記載の組成物。
3. 骨形成性蛋白がBMP-2である請求項2記載の組成物。
4. セルロース性物質がヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースからなる群より選択される請求項2記載の組成物。
5. セルロース性物質がヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースからなる群より選択される請求項3記載の組成物。
6. 高分子マトリックス成分が乳酸とグリコール酸とのコポリマーである請求項5記載の組成物。
7. 高分子マトリックス成分が多孔性粒子の形態である請求項1記載の組成物。
8. 高分子マトリックス成分が多孔性粒子の形態である請求項2記載の組成物。
9. 高分子マトリックス成分が多孔性粒子の形態である請求項3記載の組成物。
10. 高分子マトリックス成分が多孔性粒子の形態である請求項4記載の組成物。
11. 高分子マトリックス成分が多孔性粒子の形態である請求項5記載の組成物。
12. 高分子マトリックス成分が多孔性粒子の形態である請求項6記載の組成物。
13. (i) BMP-2と、
 - (ii) 高分子がポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)および乳酸とグリコール酸とのコポリマーからなる群より選択され、約150ないし850ミクロンの間の直径および粒子表面積が約0.02ないし4m²/gの間となるような多孔性度を有する高分子粒子からなる高分子マトリックス成分と、

明細書

骨形成性蛋白医薬処方物

発明の背景

本発明は、骨形成性蛋白およびその医薬処方物の分野に関する。より詳細には、本発明は、骨形成性蛋白を、軟骨および/または骨の形成を誘導させるに十分な時間、原位に局在化させるように設計された医薬処方物に関する。

骨形成性蛋白は、軟骨および/または骨の形成を誘導または助長する能力のある蛋白である。多くのかかる骨形成性蛋白は、近年、単離され、性質が調べられており、いくつかのものは組換え法により生産されている。例えば、いわゆる骨形態形成蛋白(BMP)が、無機質を除去した骨から単離されている(例えばウリスト(Urist)の米国特許第4,455,256号参照)。多くのかかるBMP蛋白が組換え法で生産されている(例えばワン(Wang)らの米国特許第4,877,964号およびワン(Wang)らの米国特許第5,013,549号参照)。形質転換成長因子(TGF- α およびTGF- β)の族が、骨の疾患の治療に潜在的に有効であると認識されている(例えばデリンク(Derynck)らの欧州特許154,434号参照)。Vgr-1と命名された蛋白が、骨形成性細胞において高レベルで発現されることが見いだされている(ライオンズ(Lyons)ら(1989年)プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)第86巻,1554~4558頁参照)。OP-1、COP-5およびCOP-7と命名された蛋白が、骨誘導活性をはっきりと示した。(オープンハイム(Oppenheim)らの米国特許第5,001,691号参照)。

骨形成を必要とする部位に骨形成性蛋白を送達させるように設計された処方物を開発する種々の試みがなされてきた。例えば、アクリルエステルポリマー(ユリスト(Urist)の米国特許第4,526,909号)および乳酸ポリマー(ユリスト(Urist)の米国特許第4,563,486号)のごときある種の高

(iii) 蛋白を局在化させる目的のカルボキシメチルセルロース

との医薬上許容される混合物からなることを特徴とする組成物。

14. 骨形成性蛋白がTGF- β である請求項1記載の組成物。

15. 骨形成性蛋白がVgr-1である請求項1記載の組成物。

16. 骨形成性蛋白がOP-1である請求項1記載の組成物。

17. 骨形成性蛋白がCOP-5およびCOP-7からなる群より選択される請求項1記載の組成物。

18. 高分子がポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)および乳酸とグリコール酸とのコポリマーからなる群より選択され、約150ないし850ミクロンの間の直径および粒子表面積が約0.02ないし4m²/gの間となるような多孔性度を有する高分子粒子からなることを特徴とする組成物。

19. 骨形成性蛋白との混合物となっている請求項18で定義した高分子粒子からなる組成物。

20. 骨形成性蛋白と、可溶性有効量のアルギニン、ヒスチジン、デキストラン硫酸、ガンマーアミノ酪酸、ベーターアミノプロピオン酸、グリシン-グリシン、グリシンエチルエステル、ヒスチジンエチルエステル、リジンメチルエステル、アルギニンメチルエステル、グアニジン、塩化ナトリウム、ヘパリン、リジン、ベータアラニンエチルエステルならびにアグマチンからなる群より選択される組成要素との医薬上許容される混合物よりなることを特徴とする組成物

21. (i) 骨形成性蛋白と、

(ii) ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)および乳酸とグリコール酸とのコポリマーからなる群より選択される高分子マトリックス成分と、

(iii) ヒアルロン酸、アルギン酸ナトリウム、ポリ(エチレングリコール)、ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマーおよびポリ(ビニルアルコール)からなる群より選択される骨形成性蛋白局在化剤

との医薬上許容される混合物よりなることを特徴とする組成物。

分子マトリックスが用いられているが、これらの処方物は、骨形成性蛋白を骨形成を誘導するのに十分な時間骨形成性蛋白を局在化させず、さらに、最適な骨形成にとっては分解するのが遅すぎることがわかった。

OPと命名された骨形成性蛋白送達用の多孔性粒子からなる生分解性マトリックスが、クバーサムパス(Kubersaapath)の米国特許第5,108,753号に開示されている。OP用の都合のよい担体は、該蛋白に結合し、徐放系として作用し、骨分化の間、個々の段階の細胞応答を調節し、該蛋白を非特異的蛋白分解から保護するものでなければならぬと開示されているが、骨形成を必要とする部位にOPを特異的に局在化させる成分を含有する処方物は示唆されていない。

オカダ(Okada)らの米国特許第4,652,441号、第4,711,782号ならびに第5,061,492号およびヤマモト(Yamamoto)らの米国特許第4,954,298号には、外側の油層中の高分子量物質に囲まれた内側の水層中に封じ込まれたポリペプチド薬剤および薬剤保持物質からなる徐放性マイクロカプセルが開示されている。骨形態形成蛋白が、かかる形成をする能力のあるポリペプチドとして挙げられているが、骨形成性蛋白のマイクロカプセル化は、最適な骨形成にとり十分なかかる蛋白の調節された放出を妨げる。

コラーゲンマトリックスもまた骨形成性蛋白用送達担体として用いられている(例えばジェフリーズ(Jeffries)の米国特許第4,394,370号参照)。コラーゲンは、患者体内で、しばしば望ましくない抗原反応を引き起こす。それゆえ、骨形成の誘導を必要とする部位において、骨形成性蛋白を局在させて、十分な時間、安全かつ効果的なかかる骨形成の誘導を行わしめることができる医薬処方物に対する必要性が残っている。

発明の概要

1の具体例において、本発明は、骨形成性蛋白、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)および乳酸とグリコール酸とのコポリマーからなる群より選択される高分子マトリックス成分、および骨形成性蛋白を局在化させるアルキルセルロースよりなる医薬上許容される混合物からなる組成物を提供する。

もう1つの具体例において、本発明は、骨形成性蛋白、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)および乳酸とグリコール酸とのコポリマーからなる群より選択される高分子マトリックス成分、そしてヒアルロン酸、アルギニン、ポリ(エチレングリコール)、ポリオキシエチレンオキッド、カルボキシビニルポリマーならびにポリ(ビニルアルコール)からなる群より選択される骨形成性蛋白を局在化させる薬剤よりなる医薬上許容される混合物からなる組成物を提供する。

別の具体例において、本発明は、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)および乳酸ならびにグリコール酸のコポリマーからなる群より選択され、所望により骨形成性蛋白との混合物となってもよい、球径約150ないし850ミクロン、粒子表面積約0.02ないし4 m^2/g となるような多孔性を有する高分子からなる組成物を提供する。

さらに別の具体例において、本発明は、骨形成性蛋白およびアルギニン、ヒスチジン、デキストラン硫酸、ガンマーアミノ酪酸、ベータアミノプロピオン酸、グリシン-グリシン、グリシンエチルエステル、ヒスチジンエチルエステル、リジンメチルエステル、アルギニンメチルエステル、グアニジン、塩化ナトリウム、ヘパリン、リジン、ベータアラニンエチルエステルならびにアグマチンからなる群より選択される可溶化有効成分よりなる医薬上許容される混合物からなる組成物を提供する。

発明の詳細な説明

本発明の実施において有用な骨形成性蛋白は、当業者によく知られており、上で記した蛋白を包含する。本発明に用いる好ましい骨形成性蛋白は、米国特許第4,877,864号、米国特許第5,013,649号、1990年10月4日付けの国際公開WO90/11366号および1991年11月28日付けの国際公開WO91/18098号においてBMP-1ないしBMP-8と同定されたBMPクラスの蛋白である。最も好ましいのは、米国特許第5,013,649号記載のごとく、その成熟蛋白が1202番目のヌクレオチドにおけるアミノ酸Glnから始まり、1543番目のヌクレオチドにおけるアミノ酸Argで終わ

る300~500mMの濃度で用いる。ヒスチジンを、約1~100mM、好ましくは10~50mMの濃度でアルギニンに添加してBMP-2を可溶化してもよい。ヒスチジンのみを可溶化剤として用いる場合、50~600mM、好ましくは300~500mMの濃度で用いる。種々のよく知られた方法を用いて本発明の骨形成性蛋白および可溶化剤を混合してもよいが、限外濾過、透析、ゲル濾過および疎水性相互作用クロマトグラフィーに限定するものではない。

本発明の実施において有用な高分子マトリックス成分は、以下に記載したような多孔性粒子に成形され、それにより原位での骨形成性蛋白のための足場を提供しう一方で、生分解性を有し、新たな骨の成長により置換される高分子物質である。その例は、アミノ酸、オルトエステル、無水物プロピレン-コーフマル酸のポリマーまたは例えば α -ヒドロキシ酢酸(グリコール酸)および/または α -ヒドロキシプロピオン酸(乳酸)のごとき1種またはそれ以上の α -ヒドロキシカルボン酸のポリマーである。後者を、そのd-あるいはl-型またはラセミ体混合物の形態で用いてもよく、ラセミ体混合物が好ましい。乳酸とグリコール酸とのコポリマー(PLGA)を用いる場合、モノマーのモル比は、1:99ないし99:1の範囲であり、対象とする臨床的状況に応じた所望の生分解時間に依存する。なお、いずれかのモノマーが50%以上であると生分解時間が延びる(より遅い生分解となる)。該高分子の分子量は、約1,000ないし100,000であり、50:50のコポリマーを用いる場合には、30,000~50,000が好ましい。高分子になればなるほど生分解時間が長くなる。

本発明の高分子マトリックス成分を、多孔性ないし中空(表面は多孔性)の形態で用いる。これ以降、これらを合わせて「多孔性粒子」という。これらの多孔性粒子は一般的に直径150ないし850ミクロンの球形である。この粒子サイズは、粒子間に十分な空間を作り、哺乳動物の骨前駆細胞を浸透させ、骨形成性蛋白によりポジティブな影響を受けさせる(骨形成活性/骨の成長速度の増加により証明される)。

骨形成性蛋白送達用マトリックスとして適当な粒子は多孔性であることが一般

るBMP-2である。勿論、2種またはそれ以上のかかる骨形成性蛋白の組み合わせを用いてもよく、同様に、骨形成性を示すかかるとの蛋白の断片およびかかるとの蛋白のヘテロダイマー形態を用いてもよい。組換え型蛋白は、自然界からの単離蛋白よりも好ましい。本発明に有用な骨形成性蛋白の量は、浸透性前駆細胞の増強された骨形成活性を刺激するのに有効な量であり、以下に述べるように治療すべき欠損のサイズおよび性質に依存する。かかる蛋白の量は用いる高分子マトリックスより少なく、好ましくは、用いる高分子マトリックス10mgにつき蛋白1~50 μg の範囲であり、より好ましくは、用いる高分子マトリックス1mgにつき蛋白0.5~5 μg の範囲である。

骨形成性蛋白を、医薬上許容される溶液または凍結乾燥形態で用いることができる。いずれの場合にも、骨形成性蛋白を、安定化ならびに可溶化するのが最良であり、好ましくは、少なくとも1mg/mlの濃度として、医薬上有効量の蛋白が、必要な体積以上の担体溶液を伴うことなく送達されるようにする。しかしながら、骨形成性蛋白、特に、BMP族の蛋白は、可溶化させるのが困難であることが証明されている点に問題がある。以下の実施例で詳述するように、全体として正電荷を帯びたアミノ酸(例えば、アルギニン、ヒスチジン、リジンおよびグリシンならびにベータアラニンのエチルエステルのごとき全体として1+の電荷を有する種)、好ましくは全体として2+の電荷を帯びたもの(例えば、ヒスチジンのエチルエステル、リジンならびにアルギニンのメチルエステルおよびアグマチン)が、この点について有用であることが発見された。該化合物の正電荷が、中和的な負電荷から十分離れて(少なくとも2~3 CH_2 単位離れて)存在する場合には、全体として電荷を帯びていないアミノ酸(ガンマーアミノ酪酸、ベータアミノプロピオン酸およびグリシン-グリシンジペプチドのごとき全体として中性の種)もこの点につき有用である。本発明に有用な他の可溶化剤は、デキストラン硫酸、グアニジン、ヘパリンおよび塩化ナトリウムを包含する。BMP-2の可溶化用として好ましい可溶化剤は、アルギニンおよびヒスチジンである(それらのエステルも含む)。アルギニンは、約50~600mM、好まし

めに要求されるが、骨形成の最適な誘導に必要な多孔性の程度は、以前には研究されていない。本発明において、多孔性粒子1個あたりの平均表面積が骨形成にとり重要であることが発見された。詳しくは、本発明による骨形成に有用な多孔性粒子は、約0.02ないし4 m^2/g の平均表面積を有していなければならない。本発明において、さらに、「多孔性化剤」(粒子表面積を増加させることにより多孔性を付与しうる組成物)を溶液中に導入して多孔性粒子を調製することにより所望の表面積を有する多孔性粒子を生産することが可能であることが発見された。多孔性粒子を、滅菌に用いる量の γ 線照射に付することによって、生分解速度を調節することも可能である。 γ 線照射量を多くすればするほど、生分解が早くなる。

以下に始まる本発明の多孔性粒子の製法により、該粒子の表面積は、同等のサイズの孔のない粒子の表面積の約2~250倍に増大する。より詳細には、400 μm の平均サイズを有する孔のないPLGA粒子は、表面積0.018 m^2/g である。対照的に、実施例1に記載のごとく、本発明において有用なPLGA粒子を、50%NaClを多孔性化剤として用いて調製すると、表面積は約0.2ないし0.6 m^2/g の間となる。シュクロースを多孔性化剤として用いると、表面積は約0.04ないし0.09 m^2/g の間となる。本発明のPLGA粒子を、実施例2に記載のごとくホモゲナイズするとともに液体の多孔性化剤を用いて調製すると、表面積は約0.02ないし4 m^2/g となる。

一般的に、本発明の多孔性粒子の好ましい製法は、ポリマーを溶解(例えば $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 中)すること、および固体および/または液体状態のNaCl、マンニトールあるいはシュクロースのごとき多孔性化剤を添加することからなる溶媒抽出法である。多孔性化剤を固体状態で添加する場合、マトリックス-多孔性化剤溶液は懸濁液の状態になる。本発明の多孔性粒子の別の好ましい製法は、溶媒抽出法であり、該方法においては、ホモゲナイズしながら液体状態の多孔性化剤を添加する。多孔性化剤を、ホモゲナイズしながら液体状態で添加する場合、マトリックス-多孔性化剤溶液は、乳化液の状態となる。いずれの方法によつて

も、マトリックス-多孔性化剤液を、攪拌および温度を調節しながら、ポリ(ビニルアルコール)のごとき界面活性剤を含有する過剰の水性溶液に添加する。残存する溶液を抽出または減圧除去することにより得られた多孔性粒子を硬化させ、乾燥させる。

本発明の多孔性であるという性質は、蛋白吸着のための十分な表面を作り出し、生分解性を増大させる。これら双方の望ましい程度は、対象とする臨床的症状に依存する。いかなる慣用的手法によっても表面積を測定できる。例えば、以下の実施例1および2においてより詳しく説明するように、マイクロメリティクス(Micromeritics) ASAP 2000システムを用いたBET表面積測定が使用できる。勿論、個々の疾患を治療するために用いる多孔性粒子の量は、治療する疾患のサイズおよび骨形成性蛋白の吸着に必要な有効量に依存する。

本発明の実施において有用な骨形成性蛋白局在化物質は、粘性および多孔性を有する医薬上許容される物質であり、骨形成性蛋白/多孔性粒子混合物中に添加した場合、損傷部位中に外科的に移植するのに適した展延性のある(パテのような)複合物を生じる。該局在化剤を生分解性多孔性粒子および骨形成性蛋白の混合物に添加すると、該蛋白を、浸潤性の哺乳動物前駆細胞の骨形成活性の速度を増加させるのに十分な時間、該マトリックス中に吸着させることができる。さらに、該局在化物質は、前駆細胞の骨形成活性の速度を最適に増加させるのに適当な時間中ずっと前駆細胞骨形成性蛋白を、該展延性のある複合物から拡散させる。かかる局在化物質がない場合、骨形成性蛋白は、該蛋白の骨形成誘導効果が臨床的に不十分であるような速度で原位置のPLGAから脱離する。

局在化剤の好ましい族は、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースを含むアルキルセルロース(ヒドロキシアリルセルロースを含む)のごときセルロース性物質であり、最も好ましいのは、カルボキシメチルセルロース(CMC)である。他の好ましい局在化剤は、ヒアルロン酸、アルギン酸ナトリウム、ポリ(エチレングリコール)、

ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマーおよびポリ(ビニルアルコール)を包含する。本発明に用いる局在化剤の量は、全処方重量を基準として0.5~20重量%、好ましくは1~10重量%であり、該量は、高分子マトリックスからの骨形成性蛋白の脱離を防ぎ、組成物を扱いやすくするのに必要な量であるが、前駆細胞がマトリックスに浸潤するのを妨害するほど多くはなく、それにより前駆細胞の骨形成活性を助長する機会を該蛋白に与える量である。本発明の実施において有用なさらなる成分は、例えばマンニトール、シュクロース、ラクトース、グルコースまたはグリシンのごとき低温保護剤(凍結乾燥している骨形成性蛋白を分解から保護)、メチルならびにプロピルパラベンおよびベンジルアルコールのごとき抗菌性保存剤、EDTA、くえん酸ならびにBHT(ブチル化ヒドロキソトルエン)のごとき抗酸化剤、およびポリ(ソルベート)ならびにポリ(オキシエチレン)のごとき界面活性剤等である。

本発明によれば、骨形成性蛋白は、PLGAポリマー化溶液中に含有されず、また、PLGAマイクロカプセル中に封入されないが、すでにポリマー化された多孔性粒子に添加される。骨形成性蛋白を多孔性粒子上に吸着させるためには、局在化剤を添加する前に、多孔性粒子を骨形成性蛋白溶液に添加するのが好ましい。勿論、医薬上許容される形態(すなわちバイロジェン・フリー、適当なpHおよび等張性、滅菌性等)の処方物の伝統的調製は、当該分野の範囲内であり、本発明の処方物に適用できる。処方物を臨床用に、単一バイアルとして処方しても、溶液もしくは凍結乾燥形態のいずれかとして処方してもよく、あるいは該処方物を、例えば骨形成性蛋白を1本のバイアルに入れて提供し、多孔性粒子および局在化剤を仕切り付きバイアルまたは複数のバイアルに入れて提供するような多成分キットとして提供してもよい。

以下の実施例4および5にあるように、本発明処方物は、軟骨および/または骨の形成が必要とされる損傷部位に治療上有効量の骨形成性蛋白を送達する展延性のある移植物を提供する。かかる移植物を、新鮮で結合していない骨折部位、骨髄融合術、および整形外科分野(頭蓋/上あご頭面の再構築)の骨欠損治療に

おける自己由来の骨移植片の代替物として、また、プロステーズ組込物の代替物、特に骨再生に関する骨髄炎、および残留歯槽隆起ならびに歯周病の病巣に関する歯科分野における表面コーティングとしてとして用いてもよい。これらの用法のうちのある種の用法においては、本発明組成物を、ポリ(プロピレン-コ-ポ-マ-ル酸)のごとき生分解性骨セメントをはじめとする種々の骨セメントと組み合わせ用いてもよい。低粘性処方物を経皮的注射物として用いて閉鎖骨折の治療を促進してもよい。上述のごとき、投薬規則を、対象とする臨床的症状のみならず種々の患者の属性(例えば体重、年齢、性別)および臨床的特徴(例えば傷の程度、傷の部位等)により決定する。

最近、新鮮な自己由来の骨が、骨移植片材料として広く用いられている。自己由来の骨については、それを取り出すためのさらなる外科的手順が必要で、供給が限られていることが、骨移植片として自己由来の骨の利用における主な不利益となっている。本発明により、本発明の多孔性粒子を自己由来の骨に添加して骨移植片の代わりに利用できる材料の量を増加させてもよい。骨の損傷部位における骨ロウの代替物として、多孔性粒子を局在化剤と組み合わせ用いて生分解性止血薬として役立ててもよい。

実施例

これらの実施例で用いるすべての成分は、医薬品級である。高分子粒子成分を、重量平均分子量約30,000~50,000、数平均分子量約20,000(ゲル濾過による)、固有粘度0.35~0.45 dL/gである、乳酸とグリコール酸との50:50(モル)のランダム・コポリマー(PLGA)から調製した。用いた骨形成性蛋白はrBMP-2である。rBMP-2の生産および特徴付けは、上で参照した米国特許第5,013,649号に詳細に記載されている。用いた局在化剤は、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ヒアルロン酸およびポリ(エチレングリコール)を包含する。用いたカルボキシメチルセルロースは、置換度0.7(セルロース上のヒドロキシ基に対するカルボキシメチル基)、粘度2480 cpsであった。

実施例1-溶媒減圧除去法による多孔性粒子の調製

PLGAをCH₂Cl₂(15% w/v)に溶解し、この溶液に多孔性化剤10gを懸濁した。得られた溶液を過剰のポリ(ビニルアルコール)水溶液(0.1% w/v)に添加した。減圧下(24インチ水銀柱)で数時間攪拌した後、粒子を過剰の冷エタノール(95%)中で硬化させた。得られた粒子を、注射用水で洗浄し、真空乾燥して流動自在の生成物を得た。マイクロメリティクスASAP 2000システムを用いてBET表面積測定を行った。表面積の測定は、固体試料の表面および孔の中でのクリプトンガスの吸着と脱離に基づく。装置により表面積が計算され印字される。

$$\frac{1}{VA[(P_0/P)-1]} = \frac{C-1(P/P_0)}{V_0C} + \frac{1}{V_0C}$$

V=圧力Pにおける吸着体積

P₀=飽和圧力

P/P₀=相対圧力

P=圧力

C=定数

A=気体断面積

V₀=単層容量

P/P₀に対して $\frac{1}{VA[(P_0/P)-1]}$ をプロットすると、傾きが $\frac{C-1}{V_0C}$

であり、切片が $1/V_0C$ である。

表面積は $S = \frac{V_0NA}{V}$ であり、ここにN=アボガドロ数であって、V=分子体積

である。

反応物の詳細および結果を、表1および表2それぞれに示す。

表 1

| バッチ番号 | PLGA (グラム) | CH ₂ Cl ₂ (mL) | 多孔性化剤 (タイプ/%) | PVA (mL) | ホモジナイザー (上部/底部) | 攪拌 (rpm) |
|-------|---------------|---|------------------|-------------|--------------------|-------------|
| 1 | 10 | 67 | NaCl/50 | 1200 | (2rshtn/A-100) | 215 |
| 2 | 10 | 67 | NaCl/80 | 1200 | (2rshtn/A-100) | 215 |
| 3 | 6.7 | 67 | suc/50 | 1200 | (2rshtn/A-100) | 215 |
| 4 | 6.7 | 67 | NaCl/50 | 1200 | (2rshtn/A-100) | 235 |
| 5 | 16 | 106 | suc/50 | 2000 | (A-310/A-310) | 140 |
| 6 | 20 | 133 | suc/50 | 2000 | (A-310/A-310) | 140 |
| 7 | 20 | 133 | suc/50 | 2000 | (A-310/A-310) | 140 |
| 8 | 20 | 133 | suc/50 | 2000 | (8.5rsh/A-310) | 100 |
| 9 | 20 | 133 | suc/50 | 2000 | (8.5rsh/A-310) | 140 |
| 10 | 20 | 133 | suc/50 | 2000 | (2rshtn/A-100) | 140 |

表 2

| バッチ番号 | Mn | Mw | Dp | 表面積 (m ² /g) | 収率% 250~710 μ m | 比重 (グラム/cc) |
|-------|-------|-------|------|----------------------------|------------------------|----------------|
| 1 | 17500 | 30800 | 1.75 | 0.54 | 27.3 | 0.41 |
| 2 | 19400 | 31700 | 1.64 | 0.037 | 71.6 | 0.67 |
| 3 | 19700 | 40900 | 2.07 | 0.089 | 92.7 | 0.70 |
| 4 | 20300 | 37700 | 1.86 | 0.28 | 69.5 | 0.37 |
| 5 | 20400 | 32600 | 1.60 | 0.035 | N/A | N/A |
| 6 | 20200 | 37700 | 1.86 | 0.079 | 79.5 | 0.64 |
| 7 | | | | 0.060 | 85 | 0.76 |
| 8 | | | | 0.038 | 85 | 0.86 |
| 9 | | | | 0.057 | 65 | 0.71 |
| 10 | 20200 | 37700 | 1.86 | 0.060 | 64 | 0.68 |

実施例 2—溶媒抽出法による多孔性粒子の調製

100 gのPLGA試料を670 mLのCH₂Cl₂に溶解した。5 gのNaClを50 mLの0.2%ポリ(ビニルアルコール)水溶液に溶解することにより、多孔性化剤溶液を調製した。該多孔性化剤溶液のうち50 mLをホモジナイザーに入れ、3300 rpmで攪拌した。ついで、PLGA溶液をホモジナイザーに入れた(攪拌しながら)。10 リットルの0.2%ポリ(ビニルアルコール)水溶液中77 mMのNaCl溶液をポンプで12 リットルの反応容器に入れ、175 rpmで攪拌した。PLGA/多孔性化剤懸濁液を90分かけて反応容器に入れた。ついで、0.2%ポリ(ビニルアルコール)水溶液中77 mMのNaCl溶液をポンプで12 リットルの反応容器に入れて出し、それにより、塩化メチレンを該混合物から抽出した。溶媒抽出が完了した後、攪拌を停止し、多孔性粒子を沈め、上清を捨て、そして、該粒子をエタノール(95%)で硬化させ、ついで、水または水中ポリソルベート20(0.05%)溶液で洗浄した。洗浄した粒子を真空または慣用的手法により乾燥させた。この方法で調製した粒子は、典型的に、0.09 g/ccのバルク比重を有し、全表面積=4 m²/gである。乾燥粒子を、エチレンオキシドにさらすことまたは γ 線照射により滅菌できる。前記したように、 γ 線照射量は生分解速度に影響する。表3に、上記方法により調製した多孔性粒子の例を示す。

表 3

| バッチ番号 | ホモジナイザー (rpm) | 多孔性化剤溶液 (mL) | 比重 (g/cc) | 収率% 150~500 μ m |
|-------|------------------|-----------------|--------------|------------------------|
| 1 | 10000 | 50 | 0.09 | 80 |
| 2 | 3500 | 50 | 0.15 | 80 |
| 3 | 6000 | 50 | 0.09 | 95 |
| 4 | 3000 | 50 | 0.10 | 95 |
| 5 | 1900 | 50 | 0.29 | 90 |
| 6 | 2200 | 50 | 0.10 | 95 |
| 7 | 2000 | 50 | 0.09 | 99 |
| 8 | 2000 | 25 | 0.14 | 90 |
| 9 | 2000 | 12.5 | 0.24 | 90 |
| 10 | 2000 | 20 | 0.28 | <75 |
| 11 | 2000 | 20 | 0.18 | >75 |
| 12 | 2000 | 17.5 | 0.16 | 95 |
| 13 | 2000 | 15.5 | 0.21 | 94 |
| 14 | 2500 | 15.5 | 0.17 | 90 |
| 15 | 2200 | 15.5 | 0.19 | 90 |

実施例3-蛋白の可溶化

以下の表4に示した賦形剤中へのrBMP-2の溶解度を、以下のごとく透析することにより測定した。濃度を、280nmにおける吸光度により測定した(吸光係数1.62を使用)。2~3mgの蛋白、0.5Mアルギニンおよび10mMリン酸(pH6.5)を含有する蛋白溶液(1ml)を、選択した0.5Mの賦形剤(表3参照)および0.5Mアルギニンを含有する1000mlの緩衝液(pH6.5)に対して透析した。透析を室温で行った。賦形剤を蛋白溶液に対して平衡化させた。ついで、該蛋白溶液を、アルギニンのみ除いた同じ組成の緩衝液1000mlに対して2回透析した。溶解度の結果を表4に示す。特に示さない場合は、賦形剤を標準濃度500mMで試験した。

| 賦形剤 | 表4 | |
|----------------------|---------------------|----------------|
| | 正味の電荷 (中性pHにおける) | 溶解度 (mg/ml) |
| ϵ -アミノカブロン酸 | 0 | <0.4 |
| δ -アミノ吉草酸 | 0 | <0.4 |
| γ -アミノ酪酸 | 0 | ≥ 1.7 |
| β -アミノプロピオン酸 | 0 | ≥ 1.1 |
| グリシン-グリシンジペプチド | 0 | ≥ 1.8 |
| グリシン | 0 | ≤ 0.4 |
| アルギニン | 1+ | ≥ 5.4 |
| リジン | 1+ | ≥ 0.9 |
| グアニジン | 1+ | ≥ 1.8 |
| グリシン(エチルエステル) | 1+ | ≥ 2.2 |
| ヒスチジン(エチルエステル) | 2+ | ≥ 2.2 |
| リジン(メチルエステル) | 2+ | ≥ 2.2 |
| アルギニン(メチルエステル) | 2+ | ≥ 2.2 |
| ヒスチジン | 1+ | ≥ 2.2 |
| デキストラン硫酸 | | ≥ 1.7 |
| 1.0M NaCl | 0 | ≥ 1.8 |

実施例4-移植体分析

rBMP-2(22 μ g)、マンニトール(8mg)およびイブシロンアミノカブロン酸(2M, 20 μ l)をPLGA粒子上(10mg, 多孔性度20%, 325 μ m)で凍結乾燥した。CMC(5.5mg, ~9%)を添加し、エチレンオキシドを用いて該固体粉末を滅菌した。注射用水(60 μ l)を添加して該複合物からなる展延性の移植体を得た。対照として、CMCを除いて同じ処方物を調製した。この場合、ゼラチンカプセルを用いて該処方物を所定の位置に保持した。両方の処方物を、ラットの5mmの大腸骨欠損部に移植した。新たな骨の生体外での分析を、X線撮影により反対側の大腸骨に対して行った。驚くべきことに、本発明処方物を用いると、大腸骨欠損の83%(12のうち10)が結合を示したが、対象では、50%(8のうち4)だけであった。

実施例5-移植体分析

300 μ Lの0.12mg/mLのrBMP-2溶液(0.25Mアルギニン、10mMヒスチジン、pH6.5に20mM塩化カルシウムを添加した溶液中)を、9.6mgの多孔性粒子(比重0.16g/cc、表面積=約0.8m²/g、2.5Mradの γ 線滅菌)に添加した。この混合物に、15mgのアルギン酸ナトリウムを添加した。ゆるやかに攪拌し、展延性複合物を得た。0.12mg/mLのrBMP-2を10mMヒスチジン添加0.25Mアルギニン、pH6.5溶液(塩化カルシウム無添加)に添加すること以外は、9mgのヒドロキシプロピルメチルセルロースまたは9mgのカルボキシメチルセルロースを用いて同様な処方物を調製した。対照として、展延性処方物を、0mg/mLのrBMP-2を含有する10mMヒスチジン添加0.25Mアルギニン溶液を用いて調製した。処方物を、ラットの頭蓋腔における臨界的サイズの8mmの円形欠損中に移植した。21日後、動物をと殺し、骨の再生を、X線生物形態計測(ケンブリッジ(Cambridge)520映像分析システムを用いたX-OMTAL高コントラストX線フィルム)により評価した。アルギン酸、CMCおよびヒドロキシプロピルメチルセルロースに関する対照は、それぞれ、18%、10%および

10%のX線不透過性しか示さなかった。アルギン酸、CMCおよびヒドロキシプロピルメチルセルロースと比較すると、組成物(rBMP-2含有)は、それぞれ、72%、70%および67%のX線不透過性を示し、有意な新骨成長を示した。

| I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If known classification system used, indicate it) According to International Patent Classification (IPC) or to any national classification and IPC Int.Cl. 5 A61K9/16; A61K9/20; A61L27/00 | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|-----------------------|----------|--|-----------------------|---|---|------|---|--|------|---|---|------|
| II. FIELDS SEARCHED Classification System: Int.Cl. 5 A61K; A61L Classification System: | | | | | | | | | | | | | | |
| Documents searched other than those mentioned in the fields searched | | | | | | | | | | | | | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US, A. 4 563 489 (M.R. URIST) 7 January 1986 cited in the application see claims</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO, A. 8 909 788 (CREATIVE BIOMOLECULES) 19 October 1989 cited in the application see claims 1-2 see page 14, line 13 - line 20 see page 15, line 1 - line 5 see page 31: MATRIX PREPARATION</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO, A. 9 009 783 (M.I.T.) 7 September 1990 see claims 1-2, 5, 8-10, 12-13 see page 4, line 16 - line 26 see page 9, line 3 - line 5</td> <td>1-21</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | Y | US, A. 4 563 489 (M.R. URIST) 7 January 1986 cited in the application see claims | 1-21 | Y | WO, A. 8 909 788 (CREATIVE BIOMOLECULES) 19 October 1989 cited in the application see claims 1-2 see page 14, line 13 - line 20 see page 15, line 1 - line 5 see page 31: MATRIX PREPARATION | 1-21 | Y | WO, A. 9 009 783 (M.I.T.) 7 September 1990 see claims 1-2, 5, 8-10, 12-13 see page 4, line 16 - line 26 see page 9, line 3 - line 5 | 1-21 |
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | | | | | |
| Y | US, A. 4 563 489 (M.R. URIST) 7 January 1986 cited in the application see claims | 1-21 | | | | | | | | | | | | |
| Y | WO, A. 8 909 788 (CREATIVE BIOMOLECULES) 19 October 1989 cited in the application see claims 1-2 see page 14, line 13 - line 20 see page 15, line 1 - line 5 see page 31: MATRIX PREPARATION | 1-21 | | | | | | | | | | | | |
| Y | WO, A. 9 009 783 (M.I.T.) 7 September 1990 see claims 1-2, 5, 8-10, 12-13 see page 4, line 16 - line 26 see page 9, line 3 - line 5 | 1-21 | | | | | | | | | | | | |
| * Special categories of cited documents: "A" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "B" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "C" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "D" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "E" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "F" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "G" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "H" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "I" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "J" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "K" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "L" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "M" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "N" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "O" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "P" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "Q" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "R" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "S" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "T" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "U" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "V" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "W" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "X" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "Y" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "Z" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application | | | | | | | | | | | | | | |
| IV. CERTIFICATION Date of the actual completion of the international search: 15 JUNE 1993 Date of mailing of this international search report: 0 07. 93 International Searching Authority: EUROPEAN PATENT OFFICE Signature: PONI U. | | | | | | | | | | | | | | |

| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>EP, A. 0 145 240 (TAKEDA) 19 June 1985 see claims see page 4, line 28 see page 8, line 3 - line 17 see page 9, line 12 - line 20</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>P, Y</td> <td>WO, A. 9 200 718 (ATRIX) 23 January 1992 see claims 1, 4-6, 10-11, 13 see page 7, line 5 - line 6 see page 7, line 23 - line 33 see page 8, line 10 see page 8, line 33 - line 34 see page 9, line 24 - line 27</td> <td>1-21</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | Y | EP, A. 0 145 240 (TAKEDA) 19 June 1985 see claims see page 4, line 28 see page 8, line 3 - line 17 see page 9, line 12 - line 20 | 1-21 | P, Y | WO, A. 9 200 718 (ATRIX) 23 January 1992 see claims 1, 4-6, 10-11, 13 see page 7, line 5 - line 6 see page 7, line 23 - line 33 see page 8, line 10 see page 8, line 33 - line 34 see page 9, line 24 - line 27 | 1-21 |
|--|--|-----------------------|----------|--|-----------------------|---|---|------|------|--|------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | | |
| Y | EP, A. 0 145 240 (TAKEDA) 19 June 1985 see claims see page 4, line 28 see page 8, line 3 - line 17 see page 9, line 12 - line 20 | 1-21 | | | | | | | | | |
| P, Y | WO, A. 9 200 718 (ATRIX) 23 January 1992 see claims 1, 4-6, 10-11, 13 see page 7, line 5 - line 6 see page 7, line 23 - line 33 see page 8, line 10 see page 8, line 33 - line 34 see page 9, line 24 - line 27 | 1-21 | | | | | | | | | |

This report lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The numbers are not mentioned in the European Patent Office EDP file as the European Patent Office is in no way liable for any particulars which are merely given for the purpose of information. 15/06/93

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|---|------------------|
| US-A-4563489 | 07-01-86 | None | |
| WO-A-8909788 | 19-10-89 | US-A- 4968590 06-11-90 US-A- 5002770 26-03-91 US-A- 5011691 30-04-91 AU-B- 628050 10-09-92 AU-A- 3444989 03-11-89 AU-B- 618357 19-12-91 AU-A- 3530589 03-11-89 EP-A- 0372031 13-06-90 EP-A- 0362367 11-04-90 JP-T- 3500655 14-02-91 JP-T- 3502579 13-06-91 WO-A- 8909787 19-10-89 US-A- 5108753 28-04-92 US-A- 5182365 26-01-93 AU-B- 627850 03-09-92 AU-A- 5174790 26-09-90 EP-A- 0411105 06-02-91 JP-T- 3504736 17-10-91 WO-A- 9010018 07-09-90 US-A- 4975526 04-12-90 US-A- 5171574 15-12-92 US-A- 5162114 10-11-92 | |
| WO-A-9009783 | 07-09-90 | None | |
| EP-A-0145240 | 19-06-85 | JP-B- 1057087 04-12-89 JP-A- 60100516 04-06-85 US-A- 4917893 17-04-90 US-A- 5061492 29-10-91 US-A- 4652441 24-03-87 US-A- 4711782 08-12-87 | |
| WO-A-9200718 | 23-01-92 | EP-A- 0489743 17-06-92 | |

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (IPC) Please See Extra Sheet. US CL Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | | | | | | | | |
|--|---|--|----------|--|-----------------------|---|---|------|---|--|------|
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/422, 423, 426, 484, 486, 489, 490, 497, 498; 514/2, 21, 773; 428/403.2, 402.21; 530/333, 840; 632/16, 17 Documents searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched (Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)) | | | | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US, A. 4 917 893 (OKADA) at 17 April 1990, col. 1-2; col. 2, line 64-65; col. 5, line 3 and 22-24</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A. 4 637 931 (SCHMITZ) 20 January 1987, col. 3, line 47-52</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | Y | US, A. 4 917 893 (OKADA) at 17 April 1990, col. 1-2; col. 2, line 64-65; col. 5, line 3 and 22-24 | 1-20 | A | US, A. 4 637 931 (SCHMITZ) 20 January 1987, col. 3, line 47-52 | 1-20 |
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | | |
| Y | US, A. 4 917 893 (OKADA) at 17 April 1990, col. 1-2; col. 2, line 64-65; col. 5, line 3 and 22-24 | 1-20 | | | | | | | | | |
| A | US, A. 4 637 931 (SCHMITZ) 20 January 1987, col. 3, line 47-52 | 1-20 | | | | | | | | | |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family sheet. | | | | | | | | | | | |
| * Special categories of cited documents: "A" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "B" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "C" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "D" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "E" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "F" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "G" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "H" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "I" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "J" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "K" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "L" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "M" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "N" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "O" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "P" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "Q" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "R" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "S" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "T" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "U" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "V" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "W" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "X" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "Y" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application "Z" documents affecting the prior art of the invention as claimed in the application | | | | | | | | | | | |
| Date of the actual completion of the international search: 06 August 1992 | | Date of mailing of the international search report: 03 NOV 1992 | | | | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/ Correspondent of Patent and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 | | Authorized officer: CARLOS AZPURU Telephone No. (703) 308-0231 | | | | | | | | | |

国際調査報告

International application No.
PCT/US92/03309

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
(IPC (3))

A 61 P 2/02, 2/28, 2/44; A 61 K 9/14, 37/12; B 32 B 5/10

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

424/ 422, 423, 426, 484, 486, 489, 490, 497, 498; 514/7, 21, 773; 428/402.2, 402.21; 530/333, 840; 423/16, 17

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) July 1992a

フロントページの続き

(72)発明者 アイザックス, ベンジャミン・エス
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01876、
テュークスベリー、ウィリアム・ジイ・ド
ライブ75番

(72)発明者 バテル, ヒマクシ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01876、
テュークスベリー、クレバー・レイン21番
(72)発明者 ケンリー, リチャード・エイ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01810、
アンドーバー、ウエストミンスター・ロー
ド10番